

Title	薬物動態・薬物相互作用の視点から薬物療法の適正化を目指して
Author(s)	深田, 耕司
Citation	平成29年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書
Issue Date	2018-04
oaire:version	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/68107
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

平成 29 年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書

ふりがな 氏 名	ふかだ こうじ 深田 耕司	学部 学科	薬・薬	学年	3 年
ふりがな 共 同 研究者氏名	さとう あつひろ 佐藤 敦弘	学部 学科	薬・薬	学年	3 年
	まえだ ともみ 前田 智美		薬・薬		3 年
					年
アドバイザー教員 氏名	前田 真一郎	所属	薬学研究科		
研究課題名	薬物動態・薬物相互作用の視点から薬物療法の適正化を目指して				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。（先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。）				

1、背景と目的

本研究では、医療現場で薬物動態・ゲノム薬理学が着目されていることを受け、薬理にかかわる遺伝子多型、シトクロム P450(CYP)分子種の変異とそれによる薬効の変化について調べることにした。CYP とは肝臓に存在する代謝酵素であり、CYP 分子種をコードする遺伝子に一塩基の変異(一塩基多型、SNP)が起こるだけで CYP の働きが著しく変化することがある。このことは実際の医療現場において問題となっており、この遺伝子型と表現型の関連性を確立し、薬物療法を適正化することが求められている。今回、対象薬剤としてデキストロメトルファン、対象 CYP 分子種としてその代謝酵素である CYP2D6 を選択した。CYP2D6 はデキストロメトルファンのほか、コデインやプロメタジン、メキシレチン、メキタジンなど、临床上重要な様々な薬物の代謝に関与している。対象薬剤としてデキストロメトルファンを選んだのは、この薬剤が鎮咳処方薬として用いられ入手が比較的簡単であり、また重篤な副作用の報告例が極めて少なく研究を安全に実施できると考えたからである。Kiss ら¹⁾によると、CYP2D6 には野生型(*1)に比べて代謝能が低下する変異型(*10、-100C>T)があり、アジア人や日本人に関してはその変異の頻度が 33~43%と高い頻度で確認されている。Kiss ら¹⁾や Lutz ら²⁾の論文など遺伝子多型と薬物動態の関係性を調査した論文の多くで、HPLC を利用し、血漿中や尿中のデキストロメトルファン及びその代謝産物であるデキストロメトルファンの定量、PCR 法を利用し被験者の遺伝子型の解析を行っている。定量に唾液を用いている論文もあるが、血漿や尿サンプルによる分析の補助として扱われていることが多い。しかし今回の実験では、血漿や尿の入手が困難であること、参考文献中において血漿や尿を用いた解析結果と唾液を用いた解析結果に大きな差異が見受けられないことから試料として唾液を用いることにした。以上より、今回の自主研究では被験者としてボランティアを募り、デキストロメトルファン含錠剤を服用してもらった後、唾液を採取、HPLC による LC-MS/MS でデキストロメトルファンとデキストロメトルファンの濃度比を算出する一方で、同時にリアルタイム PCR 法で被験者の DNA から CYP2D6*10 変異の有無を調べ、その 2 つの結果をから、CYP2D6*10 変異の頻度および CYP2D6 の遺伝子型と表現型に相関があるのかどうかを調べていくことにした。

2、方法

1)LC-MS/MS 測定条件検討

まず Waters 社の Aquity UPLC 及びタンデム四重極型質量分析装置 TQD を用いた LC-MS/MS による、デキストロメトルファン (DEX)、デキストロルファン(DOR)、内標準物質(レバロルファン ; LEV)の測定条件の検討を行った。数種類の溶媒を移動相として様々な条件で流した結果、A)2 mM 酢酸アンモニウム+0.1%ギ酸メタノール溶液と B)2 mM 酢酸アンモニウム+0.1%ギ酸水溶液を用いることにした(流速は0.300 mL/min、比率は0~1 min で A : B = 2 : 8、1~8 min で A : B = 9 : 1 へと徐々に変化させたのち 8~10 min では A : B = 9 : 1 で維持、10~11 min で A : B = 2 : 8 に戻してその比率のまま 11~14 min を流し次サンプルの測定に移った)。DEX・DOR を含む唾液溶液 255 μ L に 1.5 nmol/mL LEV 水溶液 10 μ L を加え、とし、サンプルの流入量は 20 μ L とした。表 1

にある条件で、DEX は 4.90min 付近、DOR は 2.50min 付近、LEV は 3.70min 付近にそれぞれ特異的なピークを検出することができた(図 1 参照)。そのため、以降の実験ではこの条件で LC-MS/MS による定量を行った。なお、各ピーク解析時、他 2 つのピークが検出されることがあったが、これは解析条件が類似しているため現れたとし、濃度算出の段階ではこれを無視した。

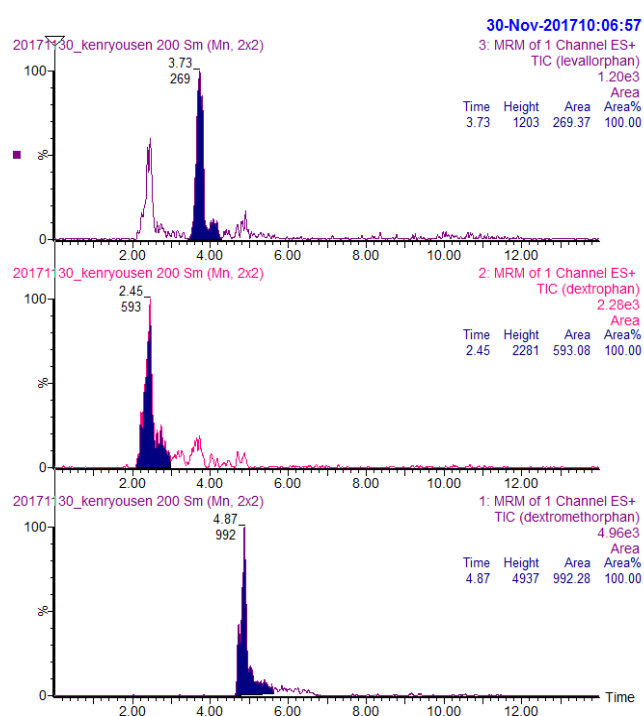


図 1、各ピークの溶出時間

表 1、本実験での MS 条件

	Mode	Parent (m/z)	Daughter (m/z)	コーン電圧 (V)	コリジョンエネルギー (V)
DEX	ESI+	272.1	171.1	40	40
DOR	ESI+	258.2	157.1	40	40
LEV(内標準)	ESI+	284.2	199.1	40	30

2)唾液サンプルの採取および前処理

本研究への同意を得られた被験者に塩野義製薬のメジコン錠剤 2 錠(1 錠中に DEX 15 mg 含有、計 30 mg)を服用してもらい、3 時間後にフナコシ社の Salivabio Oral Swab(唾液採取キット)を用いて唾液サンプルを採取した。採取したサンプルを遠心分離(3900 rpm, 5 min)し、上清と沈殿物に分離されていることを確認したのち、上清 255 μ L を上記 1)の条件に従って測定し、得られたクロマトグラフによるピーク面積を濃度定量及び濃度比の算出に用いた。Lutz ら²⁾の論文では前処理として唾液サンプルの蒸発乾固や濃縮を行っているが、本実験では濃縮せずに十分な検出感度を得られたため、その工程を省いて直接測定した。

3)検量線作成

メジコン錠を服用していない唾液サンプル 250 μ L に 1.5 nmol/mL LEV 水溶液 10 μ L を加え、そこに DEX・DOR 混合水溶液を 400 pmol/mL から 1 pmol/mL までの計 8 濃度になるように添加し、検量線サンプルとした。加えて LEV のみを含むサンプルとブランク唾液サンプルを作成した。これらのサンプルを LC-MS/MS にかかけ、得られた DEX・DOR のピーク面積を内標準物質である LEV のピーク面積で除したものを縦軸に、DEX・DOR 濃度を横軸にプロットし、検量線作成ソフトで最適な重み付けおよび回帰式を選択し、図 2、3

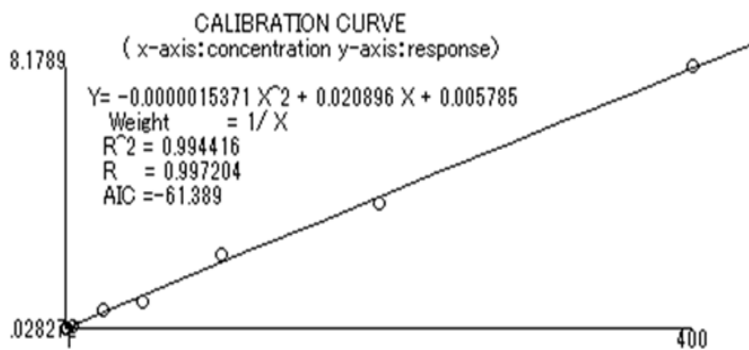


図 2、DEX の検量線

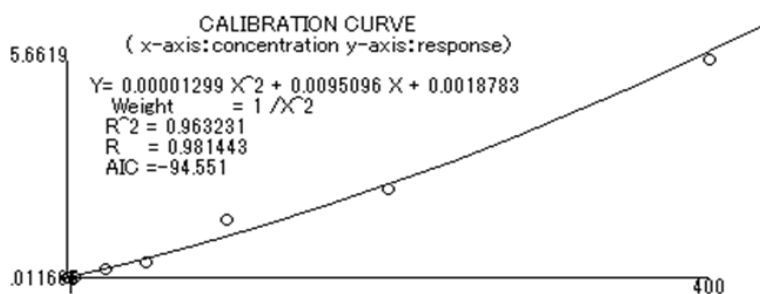


図 3、DOR の検量線

の検量線を得た(いずれの検量線も真度・精度は相対誤差が 15%以下の点が 6 点以上あり、検量線としての基準を満たしていた)。よって、以降、実サンプルの DEX・DOR の定量についてはその測定で得られたピーク面積比とこの回帰式に基づいて行った。

4)実サンプルの分析

上記 1)、3)に従って被験者から採取した唾液サンプルを分析したところ、その内 3 つのサンプルで DEX の検量線の検出限界を下回った。そのためその 3 サンプルに関しては DEX 濃度を 0 とし、濃度比を DEX/DOR として全サンプルの代謝能を比較することにした。

5)CYP2D6 の遺伝子型決定

被験者の遺伝子型決定法として、Taqman® Drug Metabolism Genotyping Assays を用いた。はじめに、被験者の内頬から採取した DNA を QIAamp® DNA Blood Mini Kit でプロトコールに従い抽出した。これに Taqman® Metabolism Genotyping Assays の CYP2D6*10 遺伝子型判定用プライマー(SNP ID:rs1065852)を用いて処理を行い、リアルタイム PCR によって DNA の増幅および解析を行った。その結果から、CYP2D6 の遺伝子型を決定した。

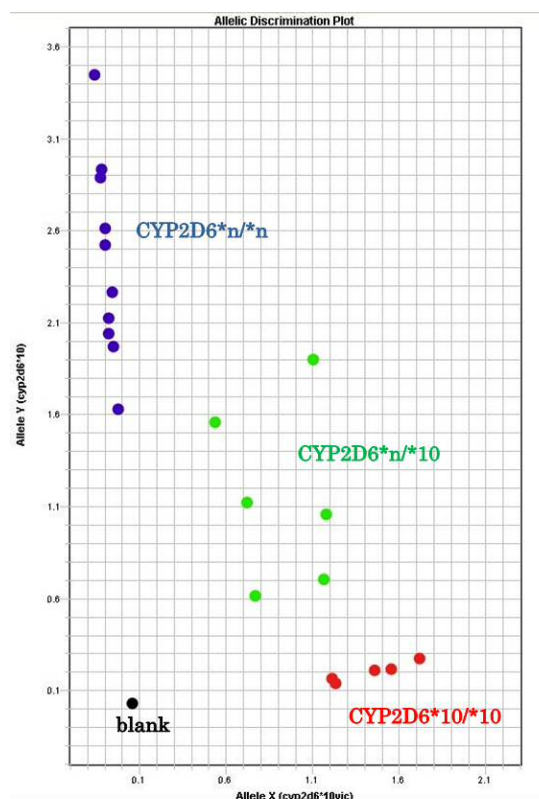


図 3、RT-PCR による CYP2D6*10 の解析結果

3、結果と考察

計 21 名を被験者として、上記の方法で DEX の代謝能と CYP2D6 の遺伝子型を調査した。リアルタイム PCR による CYP2D6 の遺伝子型決定の結果を図 4 に、遺伝子型別の濃度平均・分散・標準偏差を表 2、男女別の濃度平均・分散・標準偏差を表 3 に示す。CYP2D6 コード遺伝子の*10 変異アレル発現頻度は 16/42 であり、変異の頻度は 38.1%と、既報と同程度であった。また有意水準を 5%とし、F 検定やボンフェローニ法を用いた T 検定を各群で行ったところ、A(*n/*n、*1 でない可能性があるため、*10 変異がないものを*n と表記する)群と B(*n/*10)群を比較した場合(P 値) = 0.384、B 群と C(*10/*10)群では(P 値) = 0.150 であったのに対し、A 群と C 群では(P 値) = 0.0339 と

表 2、CYP2D6 遺伝子型による代謝能

	人数	濃度比平均 (DEX/DOR)	分散	標準偏差
*n/*n	10	0.217	0.117	0.224
*n/*10	6	0.373	0.0700	0.233
*10/*10	5	0.592	0.142	0.299

表 3、男女別による代謝能

	人数	濃度比平均 (DEX/DOR)	分散	標準偏差
男	14	0.387	0.154	0.335
女	7	0.363	0.136	0.265

有意差は見られなかったものの変異を持たない群との比較において*10/*10 の遺伝子型では代謝能が低下する傾向が見られた。表 2 に示されている濃度比の平均からも減少傾向がみられた。今回は有意差が見られなかった理由の一つに被験者数が少なかった可能性が考えられ、被験者数を増やして検討する必要があると思われる。また、*10 変異を持たない A・B 群でも、頻度の低い他の変異を有していることにより代謝能が異なっている可能性も挙げられる。今回は*10 変異のみの調査であったが別の変異についても調べてみることで遺伝子型と表現型の相関をより詳細に調べることができると思われる。また表 3 より男女間で代謝物の濃度比には違いが見られなかったため性別の違いに対するデキストロメトルファン代謝能には違いはないと考えられた。

今回、CYP2D6 の変異を頻度の高い*10 に絞って調査・実験したが、遺伝子型から想定されるものとは多少異なる結果となった。薬物療法の適正化・遺伝子型と表現型との関連性の確立にはより大規模かつ詳細な実験調査が必要とされる。現場でゲノム薬理学が重視されるなか、代謝酵素などといった薬物代謝にかかわる様々な要因を一つ一つ調べていくことが今後大切になっていくだろうと思われる。

4、参考文献

1) Ádám Ferenc Kiss, Katalin Tóth, Cintia Juhász, Manna Temesvári, József Paulik, Gábor Hirka, Katalin Monostory

Is CYP2D6 phenotype predictable from CYP2D6 genotype?

Microchemical Journal 136(2018) 209–214

2) Ursula Lutz, Wolfgang Völkel, Roman W. Lutz, Werner K. Lutz

LC–MS/MS analysis of dextromethorphan metabolism in human saliva and urine to determine CYP2D6 phenotype and individual variability in N-demethylation and glucuronidation

Journal of Chromatography B, 813 (2004) 217–225

3) 大橋京一・藤村昭夫・渡邊裕司 (2012)「疾患からみた臨床薬理学」第 3 版 じほう